

化粧品基材に利用可能なペプチド界面活性剤のバクテリア合成系構築

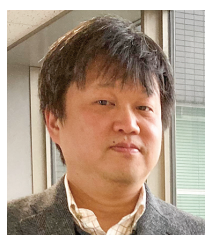
名古屋工業大学大学院工学研究科

水野 稔久

Our aim is to create a bacterial synthesis system for the peptide gemini (PG)-surfactants, previously known for their antibacterial properties. We focused on the Polymyxin B synthesis enzyme, structurally similar to our target PG-surfactants. This enzyme, part of the non-ribosomal peptide synthesis (NRPS) family, comprises ten modules, each with an A domain for substrate amino acid adenylation, a T domain for conversion to thioester form, and a C domain for peptide chain elongation. To adapt this enzyme for PG-surfactant synthesis, we needed to modify the A domain's substrate amino acids to cysteine derivatives with alkyl chains. Prior studies suggested A domain mutation allows this conversion, yet details on the Polymyxin B A domain structure and crucial amino acids were scarce. In our study, we cloned and sequenced the ten Polymyxin B enzyme modules from *P. polymyxa* NBRC3020, expressed them in *E. coli*, purified the proteins, and tested each A domain's adenylation activity. We confirmed their ability to adenylate the respective substrate amino acids. Next, to activate modified cysteine derivatives with C1, C2, or C3 alkyl chains to SH groups, we introduced mutations in the 10th module's A domain. Our results showed these mutations successfully enabled the adenylation of these modified cysteine derivatives.

1. 緒 言

「マイクロプラスチック問題」や「オーガニック志向」な風潮から、化粧品基材が天然由来成分であることや生分解性を持つことは、環境面への配慮のみならず利用者の健康面からも需要は高い。界面活性剤は化粧品に必須の基材であるが、アミノ酸やペプチドを極性基として含む界面活性剤はこの要件を満たす。しかし現状価格が高いため、その利用は限定されている。一方「薬用化粧品」の「有効成分」として、「細胞増殖因子様ペプチド」のような高度な生理活性ペプチドの利用も進んでいる。最近我々のグループでは、ペプチドを極性基として持つジェミニ型の界面活性剤 (PG-surfactant) の研究開発を進めており、低濃度の添加でも (臨界ミセル濃度 $\sim 0.00001\text{wt}\%$) 様々な疎水分子を水中に分散できる基礎的性質に加え、高い抗菌活性を示す試薬開発に成功した (MIC $\sim 4\mu\text{g/mL}$ 、以下「抗菌性 PG-surfactant」と呼ぶ)¹⁾。更に一部の誘導体については、細胞毒性なく哺乳類細胞 (線維芽細胞や間葉系幹細胞など) に効率よく取り込まれるものも見つかっており、種々の生理活性ペプチドを細胞内まで送達可能な「細胞膜透過キャリア」としての利用も可能である²⁾。しかしこちらの化粧品基材としての実用化を考えた場合には、生産コストの問題を解決する必要がある。



Construction of Bacterial Synthesis System for peptide gemini surfactants Usable in Cosmetics Substrates

Toshihisa Mizuno

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

そこで本研究では、比較的安価に単鎖ペプチドの生産が可能な「バクテリアの非リボソームペプチド合成 (NRPS) 系」³⁾に着目し、新たな生産技術の開発に取り組む。具体的には、「抗菌性 PG-surfactant」に構造類似した抗生物質 Polymyxin B を生産可能な NRPS 合成酵素への変異導入により、「抗菌性 PG-surfactant」の生産を可能とする組換えバクテリア構築を最終的には目指したい。しかしこのためには、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を取り込んだペプチドの合成可能な NRPS 合成酵素の開発が必要であった。そこで本研究では、まず Polymyxin B 合成に関する NRPS 酵素の中に含まれる、基質アミノ酸の活性化に寄与するアデニル化 (A) ドメインに関して調査した。次に、この A ドメインへの変異導入により、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を活性化可能な A ドメインの開発に取り組んだ。最終的に、Polymyxin B に対する NRPS 合成酵素を持つ *P. polymyxa* へこれを組み入れるところまではできなかったが、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を含む非リボソームペプチド合成を可能とする NRPS 酵素は天然に存在しないため、多くの示唆を与える結果が得られたものと考えている。

2. 方 法

2.1. 各モジュール遺伝子のクローニングと各モジュールのアミノ酸配列の決定

P. polymyxa NBRC3020 株は独立行政法人 製品評価技術基盤機構から入手し、TSBYE⁴⁾を培地に 30℃にて一晩培養することで増殖させた。この細菌に表1のプライマーを直接添加して行うダイレクトPCRによって、各モジュール部分の遺伝子クローニングは行った。なお

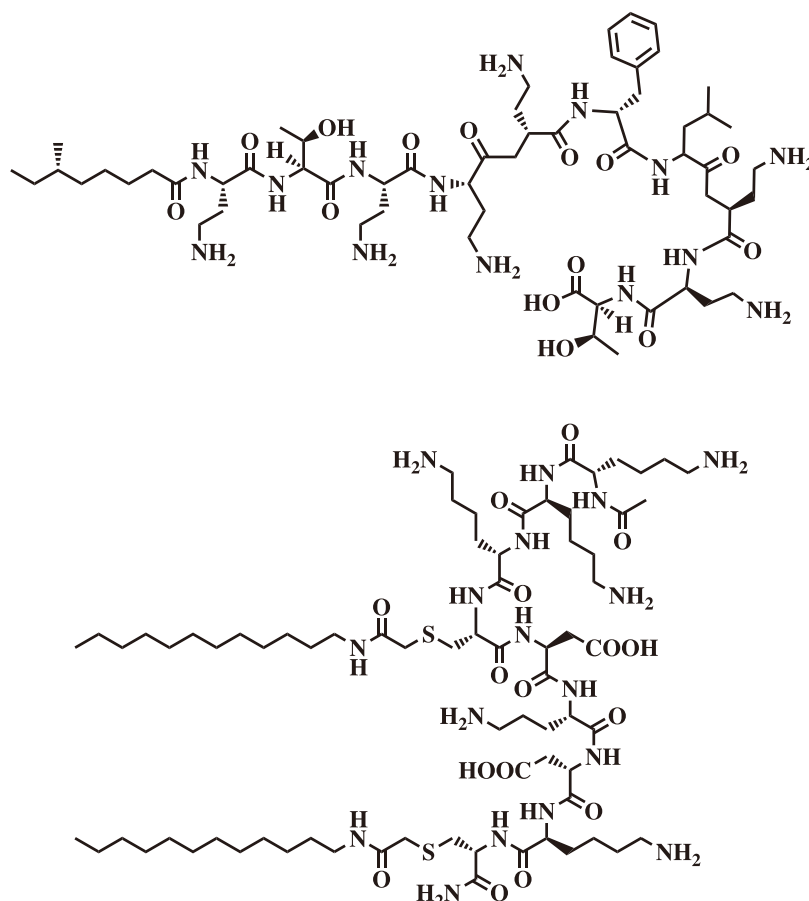


図 1 Polymyxin B (上、閉環前の構造) と抗菌性 PG-surfactant (下) の化学構造

NBRC3020 株は遺伝子情報が存在しなかったため、*P. polymyxa* E681 株⁵⁾の各モジュール部分の遺伝子配列を参考にプライマーは設計した。Gibson Assemblyによって、各遺伝子を pET-21d (+) のマルチクローニングサイトに導入し、これを DNA シークエンスすることで各モジュール内のアミノ酸配列は決定した。

2.2. 各モジュールの蛋白質発現と単離精製

各発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加後、20℃、12 時間の培養条件で蛋白質発現は行った。集菌後、50 mM Tris Buffer (pH 7) に菌を懸濁し、超音波破碎により抽出を行った。ここで上清成分に可溶性蛋白質として得られたモジュールについては、Ni-NTA His bind resin (ノバジェン社) を用いて単離精製を行い、限外濾過 (Amicon Ultra-4, 分画分子量 50 kDa) により濃縮を行った。純度確認は、15% SDS-PAGE により行った。

2.3. 各モジュールに含まれるAドメインのアデニル化活性の評価

モジュール蛋白質(終濃度 10 μ M)、基質アミノ酸あるい

表 1 用いたプライマーの DNA 配列

	基質 アミノ酸	フォワードプライマー	リバースプライマー
モジュール 1 (4521 bp)	L-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>GTTGAG</u> AGAGAATATCCAAAGA-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>GTTGAG</u> CAITTCACGAGAG-3'
モジュール 2 (3297 bp)	L-Thr	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>CAGGA</u> GACCGCGGAG-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>GCTGTCC</u> GTCAAGATATCCA-3'
モジュール 3 (bp長不明)	D-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATACATG <u>TIGAC</u> GGACAGCGAAAAAG-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>GAGGAC</u> GGCGCAGG-3'
モジュール 4 (bp長不明)	L-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>CGCGC</u> GGAAAAAGAGCA-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>CGCGGT</u> CGCAGAGC-3'
モジュール 5 (3333 bp)	L-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>CCGCGC</u> GGAAAAAGAGCAA-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>GAAAAAT</u> AATATCAATGGCTC-3'
モジュール 6 (3951 bp)	L-Leu	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>TTTGA</u> AAAGCGCGGGAG-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAAG <u>GTCAA</u> TTCTGGT1TTCTT-3'
モジュール 7 (3105 bp)	L-Thr	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>AAGAC</u> GCTCGTTCAATGTT-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAGC <u>CAAGT</u> CAGCTCGGCAAT-3'
モジュール 8 (3138 bp)	L-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>TCCA</u> CCGCGTGTGTTG-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAGC <u>CAAGTT</u> CAGCTCGGCG-3'
モジュール 9 (3204 bp)	L-Dab	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>TCCA</u> CCGCGTGTTC-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAGC <u>CAACGC</u> GAATTGCATG-3'
モジュール 10 (3345 bp)	L-Thr	5'-TCTAGAAATAATT1TTGTTAACTT TAAGAAGGAGATATACATG <u>AAATC</u> TTTGTTTAAAAA-3'	5'-ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT CTCGAGTGGCGGCCGAGC <u>GCTCCA</u> TGCAGTACCGCGGCT-3'

*下線の配列が、各モジュールの遺伝子配列と重複する部分

はリファレンスとなるアミノ酸 (終濃度 1 mM)、ピロホスファターゼ (0.2 unit/mL)、MgCl₂ (10 mM)、DTT (1 mM)、10% グリセロールを含む 50 μL の Tris HCl 緩衝液 (50 mM, pH 7.5) を 25 °C に保ち、ここへ ATP を終濃度 1 mM で添加することにより、酵素反応は開始した⁶⁾。そのまま 25 °C で 1 時間反応後、Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems 社製) を添加し 25 °C で 20 分インキュベーションすることにより、溶液中に遊離したリン酸イオン濃度の非色定量を行った。この濃度を元に、間接的に基質アミノ酸のアデニル化割合の定量化を行った。一方でターンオーバー数 k_{cat} 、ミカエリス定数 K_m 、 k_{cat}/K_m などは、同様の反応を異なる基質アミノ酸濃度、反応時間でそれぞれ測定を行い、このプロットデータから得られる反応初速度と、各基質アミノ酸初濃度のデータを用いた Lineweaver-Burk plot から算出は行った。

2. 4. 基質アミノ酸認識サイトへの遺伝子変異と S アルキル化システインを基質アミノ酸として用いたアデニル化活性の評価

DNA シークエンス結果により明らかとなった各モジュールのアミノ酸配列を元に、AlphaFold 2 によって立体構造の推定を行った。

2. 5. 基質アミノ酸を、アルキル鎖を側鎖修飾された Cys に変換されたモジュール 10 の構築

立体構造予測を元に活性サイトで基質アミノ酸の識別にキーとなっているアミノ酸を特定し、ここへアミノ酸変異を行った変異体を構築することで、改変されたモジュール 10 の構築を行った。モジュール 10 の遺伝子に対して変異を導入し、2. 2. ~ 2. 3. と同様の方法にて、蛋白質発現、単離精製、酵素活性評価を行った。

3. 結 果

3. 1. モジュール 1 ~ 10 までの遺伝子クローニングとアミノ酸配列の決定

Polymyxin B は 10 個のアミノ酸と、主鎖アミノ基に縮合される 1 個の脂肪酸から構成されており、L-Dab⁴ の側鎖アミノ基と L-Thr¹⁰ の主鎖カルボキシ基が最後に縮合されることで、環化された目的生成物は合成される。NRPS 酵素全体は、構成する 10 個のアミノ酸に対応する 10 個の酵素モジュールが連結された構造を持ち、さらにそれぞれのモジュールには基質アミノ酸のアデニル化を担う A ドメイン、これをチオエステル体として保持する T ドメイン、さらにこれと一つ前の T ドメインにチオエステル体として保持されている伸長ペプチド鎖どうしを縮合する C ドメインを含む。Polymyxin B の NRPS 合成酵素の各モジュールは、*pmx A*、*pmx B*、*pmx E* の 3 つの遺伝子領域に保持されている (図 2)⁵⁾。今回まず、各モジュール遺伝子をクローニングし、それぞれを可溶性蛋白質として得て、さらに A ドメインのアデニル化活性を評価可能する必要がある。これを勘案し、表 1 に示した DNA プライマーを用いて各遺伝子のクローニングは行った。しかし、モジュール 3、4 に関しては配列相同性が高いためか、うまくそれぞれの遺伝子部分のクローニングができなかった。しかしこちらは遺伝子領域を切り出すための DNA プライマーをさらに最適化することで、最終的には達成できるものと思われる。得られた各モジュール遺伝子は、Gibson Assembly によって pET-21d (+) のマルチクローニングサイトに導入し、これを DNA シークエンスすることで各モジュール内のアミノ酸配列は決定した。図 3 (a) には、一例として決定されたモジュール 7 のアミノ酸配列を示し、図 3 (b) には、決定されたアミノ酸配列を元に推定されたモジュール

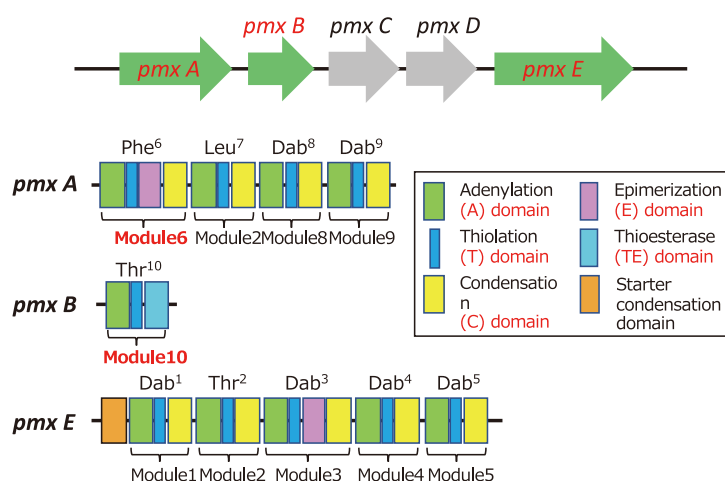


図 2 Polymyxin B の NRPS 合成に関わる遺伝子の配置 (合成酵素を構成する 10 個のモジュールは、Pmx A、Pmx B、Pmx E の 3 種類の蛋白質に振り分けられている)

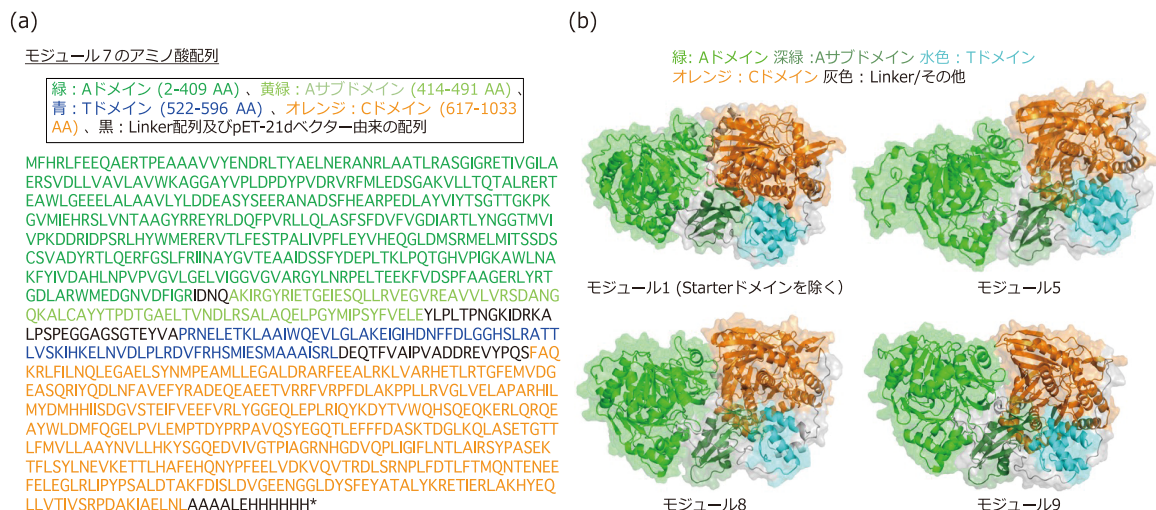


図3 決定されたアミノ酸配列の例と AlphaFold 2 により推定された酵素モジュールの立体構造：(a) モジュール7(118.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)のアミノ酸配列、(b) モジュール1(172.0kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール5 (124.6 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール8 (118.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール9 (119.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)の推定立体構造

ル1、5、8、9の立体構造を示した。いずれのモジュールについても、含まれると想定されていたA、T、Cドメインなどを含むことがわかり、目的とする各モジュール遺伝子のクローニングができていたことが示された。また、各モジュールのアミノ酸情報の報告がある *P. polymyxa* E681株と配列相同性を評価したところ、Aドメインについては90%以上の高い相同性を持っていることがわかった。

3.2. 酵素モジュールの大腸菌を用いた蛋白質発現と単離精製

各モジュールの発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3) 株に導入し、蛋白質発現と単離精製に取り組んだ。まずIPTG添加による発現誘導を行ったところ、いずれのモジュールについても大腸菌による十分な生産量での異種発現が可能であることが分かった (図4 (a))。しかしその後、各酵素モジュールの単離精製のため、超音波処理による破碎バ

ッファーへの抽出を試みたが、上清画分として得られたのはモジュール1、5、6、8、9、10のみであった。モジュール2については、Pmx Eの一部をモジュール単位で切り出す形となるが、クローニングされたシーケンス結果からは、モジュールの全遺伝子領域は確実に取り出せていた。この結果は、Polymyxin Bの各酵素モジュールを水溶性蛋白質として得るためには、単純にモジュール単位で切り出して蛋白質発現するのではダメな場合もあるということがわかった。上清画分に得られた酵素モジュールに関しては、His-tagを用いたアフィニティーカラム精製を行い、その後のアデニル化活性の評価に十分な純度で得られたことをSDS-PAGE分析により確認した (図4 (b)) には一例として、モジュール1、6の結果を示す)。

3.3. 大腸菌を用いた各モジュールの蛋白質発現、そこに含まれるAドメインの活性評価

モジュール1、5、6、8、9、10に含まれるAドメインのアデニル化活性に関して、評価を行った。各モジュールに特異的な基質アミノ酸、これに構造類似性の高いもの、あるいはPolymyxin Bに含まれる他のアミノ酸などを1 mMの終濃度で加え、さらにATPを終濃度100 μ Mで添加後、25℃、1時間の反応条件で酵素反応を行った。なお酵素活性については、アデニル化反応の副生成物となるピロリン酸をリン酸に分解し、このリン酸濃度をモリブデン酸マラカイトグリーンアッセイにより定量化することで、間接的に評価した。

その結果、まず各モジュールは想定通りの基質アミノ酸に対して特異性を持つことがわかり、遺伝子クローニングの段階で目的とする各モジュール遺伝子が取得できている

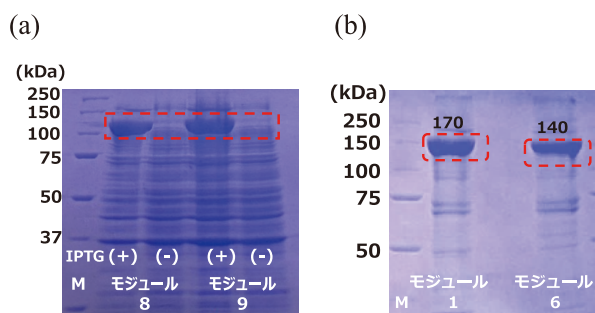


図4 (a) 15% SDS-PAGEを用いた大腸菌 BL21 (DE3) 株による、モジュール8、9のIPTG誘導による発現確認、(b) 15% SDS-PAGEを用いた単離精製された酵素モジュール1、6の純度確認

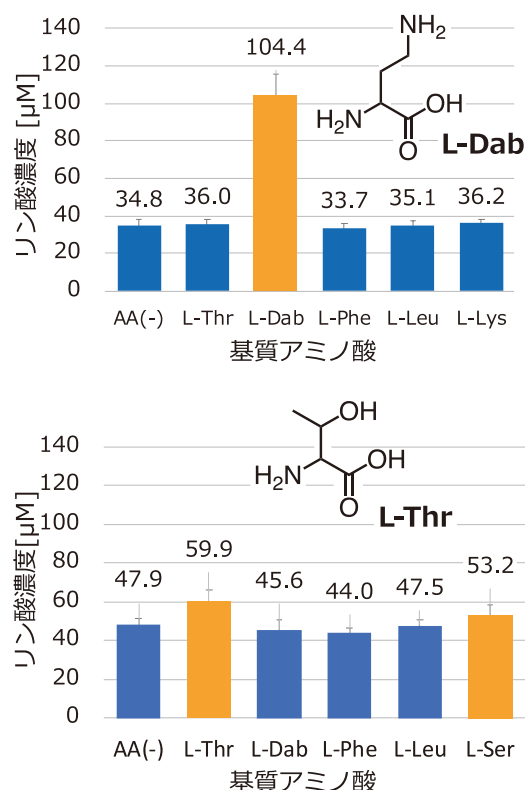


図5 モジュール5(上)、モジュール10(下)のAドメインにおける各基質アミノ酸に対するアデニル化活性の基質選択性に関する評価

ことが改めて示唆された(図5はモジュール5と10の結果を示す)。またモジュール10に関しては、元々の基質アミノ酸であるL-Thrだけではなく、構造的に類似したL-Serに対しても弱いながら活性をもつことが分かった。一方で、L-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、6、8、9については、L-Dabと比較的構造的に類似したL-Lysには全く活性をもたないこともわかり、モジュールごとの基質アミノ酸に対する特異性、厳密さに関しては、モジュールごとにその性質が異なることが分かった。

次に酵素活性の比較的高かった、モジュール1、5、8、9、10について、基質アミノ酸濃度を変化させた時の初速

度データを元にしたLineweaver-Burk plotにより、アデニル化活性のターンオーバー数 k_{cat} 、ミカエリス定数 K_m 、 k_{cat}/K_m を算出した(表2)。今回の評価では、Tドメインに対して4'-ホスホパンテテイン(4'-PPT)が導入されたホロ状態で評価を行っていないため、酵素はシングルターンオーバーの条件での評価となり、全体的な活性は低く見積もられた。しかし、得られたパラメーターを比較したところ、L-Dabを同じ基質アミノ酸として用いるモジュール5、8、9については、類似の酵素活性をもつことがわかった。一方でL-Thrを基質アミノ酸として用いるモジュール10については、L-Dabを基質アミノ酸として用いるモジュールと比較し、約1/50程度の活性であることが分かった。

3. 4. Aドメインが基質アミノ酸をL-Dabにする場合、L-Thrにする場合にキーとなるアミノ酸残基の構造予測データを元にした考察

L-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、8、9、L-Thrを基質アミノ酸とするモジュール10について、各基質アミノ酸の認識にキーとなるアミノ酸の特定を、AlphaFold 2による立体予測構造を元に行った。まずL-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、8、9のAドメインにおける、基質結合サイト周辺の構造類似性に関して、各立体構造を重ね合わせた場合の平均二乗偏差(RMSD)も含めて評価した。まず全体的な傾向として、L-Dabを基質アミノ酸とするこれらモジュールに含まれるAドメインでは、高い配列相同性と共に、認識に関与するアミノ酸残基コンホメーションの類似性も推測された。具体的には、L-Dabの α -アミノ基はAsp204の側鎖カルボキシ基、 γ -位の側鎖アミノ基はAsp310により認識される一方で、アデニル化における補因子となる Mg^{2+} イオンはThr305、ATP由来のリン酸イオンはAsp394により認識される(図6)。これらは、モジュール1、5、8、9間で高い保存性が見られた。本研究ではL-Thrを認識するモジュール10に対して、側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるように改変を行ったが、もしこれらの

表2 Lineweaver-Burk plot による各モジュールに含まれるAドメインのアデニル化活性の評価

Module	基質アミノ酸	MW (kDa)	k_{cat} [min^{-1}]	K_m [mmol L^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$]
モジュール1	L-Dab	172.0	0.061	0.261	0.235
モジュール5	L-Dab	124.6	0.550 ± 0.340	0.445 ± 0.210	0.826 ± 0.619
モジュール8	L-Dab	118.3	0.663 ± 0.058	1.09 ± 0.228	0.623 ± 0.095
モジュール9	L-Dab	119.3	0.478 ± 0.095	0.411 ± 0.029	1.15 ± 0.142
モジュール10	L-Thr	124.6	0.014 ± 0.004	0.725 ± 0.640	0.019 ± 0.007

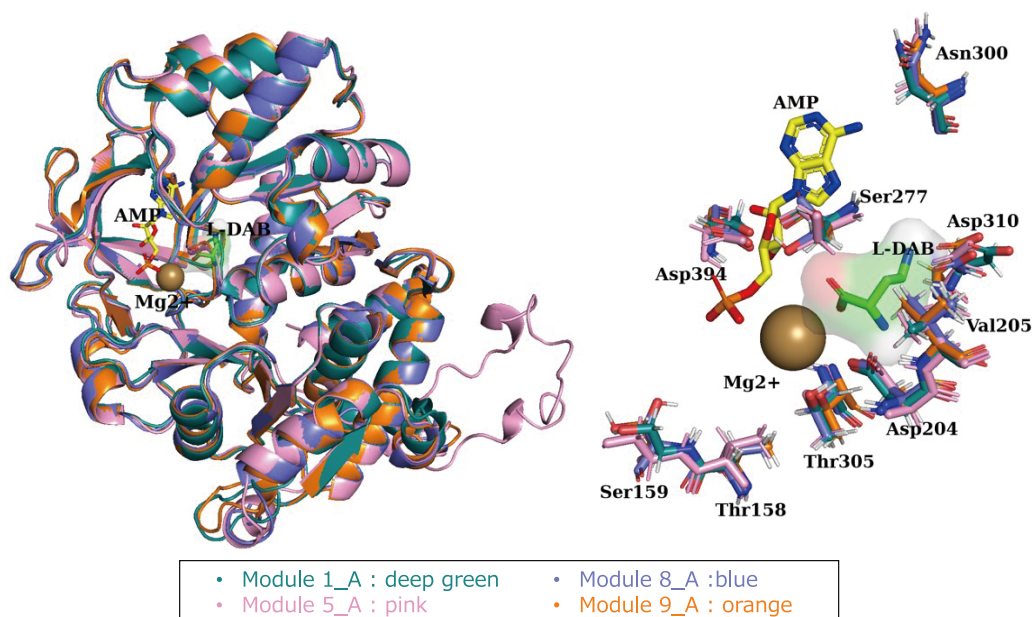


図6 モジュール1、5、8、9のL-Dabの結合サイト周辺の立体構造の比較(左)と結合サイト周辺のアミノ酸残基の比較(右)

モジュールをアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるよう改変するのであれば、Asp310を含めた周辺アミノ酸残基に対する変異が有効であると示唆された。

一方で、L-Thrをアデニル化するモジュール10のAドメインについては、L-Thrの α -アミノ基は同様にAsp204の側鎖カルボキシ基により認識される一方で、L-Thrの側鎖はPhe466が蓋をする形で認識をしていると推測された。アデニル化における補因子となるMg²⁺イオンはThr305、ATP由来のリン酸イオンはAsp394により認識されるのは変わらなかった。したがって、側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるようにモジュール10を改変するには、Phe466周辺へのアミノ酸変異が有効であることが示唆された。

3.5. アルキル鎖修飾システインのアデニル化を可能とするモジュール10への改変

モジュール10のAドメインを、アルキル鎖修飾システイン誘導体をアデニル化可能なものに変換するための変異候補残基について、AlphaFold2により予測されたモジュール10のAドメインの活性サイトへS-メチル化CysのAutoDock7によるドッキングシミュレーションを元に考察した。Asp204がL-ThrやL-Cysの α -アミノ基の認識に働いていることが予想され、こちらは*S. Albus*のNRPSに含まれるCysを基質アミノ酸として利用するAドメインでも保存されていた。一方で元々の基質アミノ酸であるL-Thrと比較し、アルキル鎖修飾システインでは側鎖方向の立体的高さが大きく、先の項目で指摘していたように

Phe⁴⁶⁶が明らかに立体障害となることが予想された。

そこで、ここへのAla変異体(Phe466Ala)であれば、アルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるAドメインとして機能することが期待された。PCRとGibson Assembly技術を用いてこの変異体の発現ベクターを調製し、*E. coli* BL21 (DE3) 株を用いて蛋白質生産を行った。大腸菌からの抽出を行ったところ元のモジュール10と同じように上清画分に得られたため、これをHis-tagカラムを用いて精製し、アデニル化活性の評価を行った。基質アミノ酸には、L-Thr、L-Serと共に、L-Cys、S-メチルL-Cys (L-Cys (Me))、S-エチルL-Cys (L-Cys (Et))、S-アリルL-Cys (L-Cys (All))を用いて活性評価を行ったところ、元々のモジュール10の基質アミノ酸であるL-ThrやL-Serに対する酵素活性が大きく減少した。一方でAドメインでは全く活性の見られなかった、L-Cys (Me)、L-Cys (Et)、L-Cys (All)に対してアデニル化活性が得られることが明らかとなった(図7)。本来は、この変異体をリードとして、擬似基質を用いた酵母ディスプレイ法などを用いたセレクション系に進んでいったかったのであるが、図8に示した擬似基質合成法の確立には至ったものの、残念ながら本研究助成期間が終了してしまった。本期間内に達成しきれなかったのは非常に残念であったが、今後は合成法の確立された擬似基質を用いたセレクション系を用い、当初目的となる側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるモジュール取得、さらにこれを*P. polymyxa*に戻すことで、抗菌性PG-surfactantの合成が可能な組換えバクテリアの構築を目指していきたい。

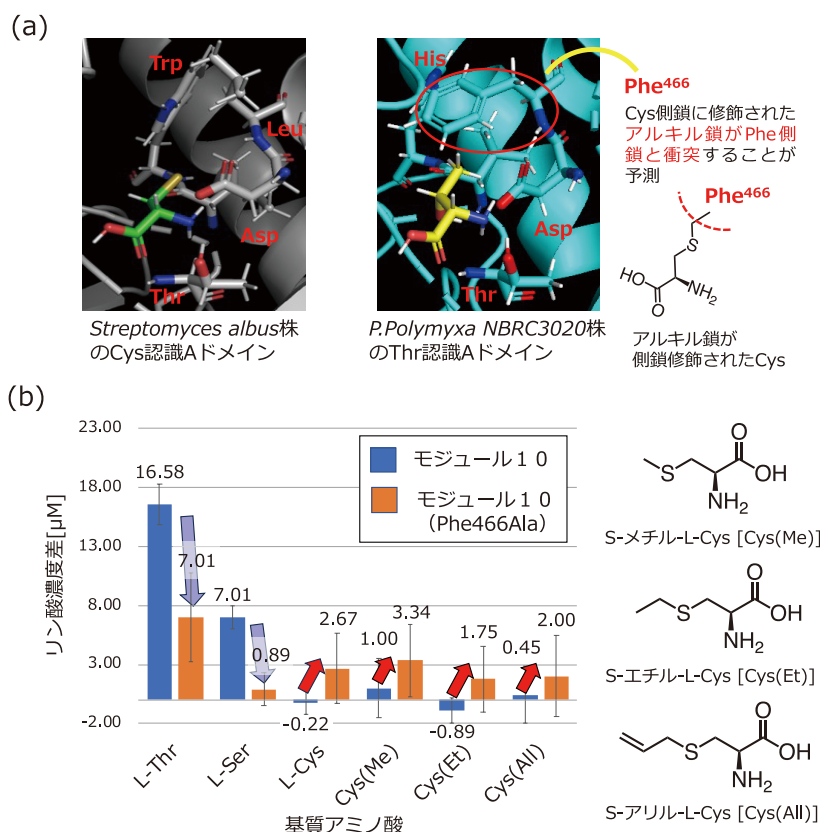


図7 アルキル鎖をSH基に修飾されたシステイン誘導体のアデニル化活性の評価；(a) *S. albus* のCys認識Aドメインと *P. Polymyxa* NBRC3020株のThr認識Aドメインの構造比較、(b) モジュール10のAドメインと、このAドメインに対してPhe466Ala変異を加えた変異体でのL-Thr、L-Ser、L-Cys(Me)、L-Cys(Et)、L-Cys(All)に対するアデニル化活性の比較

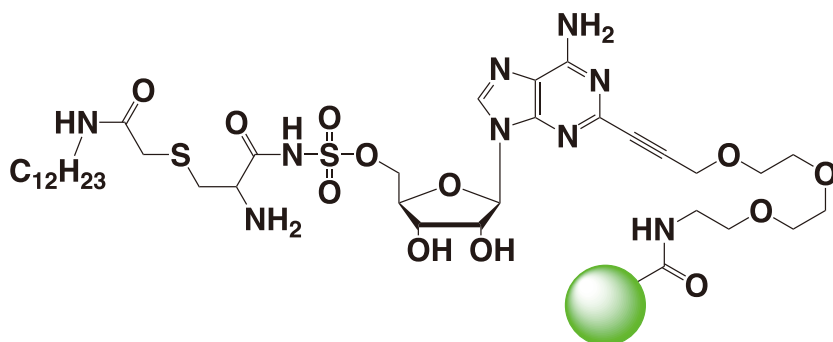


図8 合成法の確立ができた擬似基質の化学構造 (Aドメインでの反応生成物となる、アデニル化されたアルキル鎖修飾Cysに類似した化学構造をもつ。ホスホジエステル部分をスルホンアミドに変更することで、加水分解を受けずにAドメインに留まる。またこの基質を固定相に固定化しセクション実験に用いるため、ビオチンをアデニン部分にアセチレン化PEGリンカーを介して導入した。黄緑色の丸部分に、ビオチンは修飾される)

4. 総括

本研究では、我々が以前に抗菌活性を示すと明らかにしたジェミニ型ペプチド界面活性剤 (抗菌性PG-surfactant) のバクテリアによる合成系構築を目指し、構造の比較的類似したPolymyxin Bの合成酵素に着目した。この酵素は非

リボソームペプチド合成酵素の1つであり、Polymyxin Bに含まれる10個のアミノ酸に対応した10個の酵素モジュールが連結された構造をもつ。抗菌性PG-surfactantの合成を可能とする酵素へと変換する上で、Aドメインの基質アミノ酸を側鎖にアルキル鎖を含むシステイン誘導体に変換が必要であるが、以前の報告において、Aドメインに対

して変異を加えることで、基質アミノ酸の変換が可能であり、結果産生される非リボソームペプチドへの変異も可能となると報告があった。しかし Polymyxin B 合成酵素の A ドメインに関しては、先行研究による構造情報がほとんどなく、各基質アミノ酸の認識でキーとなる A ドメイン内のアミノ酸残基が不明であった。そこでまず、Polymyxin B の合成酵素に含まれる 10 個のモジュール遺伝子を *P. polymyxa* NBRC3020 株からクローニングし、こちらのアミノ酸配列を明らかとした。またこれらが大腸菌にて発現し、各モジュール蛋白質を精製後、それぞれに含まれる A ドメインのアデニル化活性を評価し、確かにそれぞれが対応する基質アミノ酸のアデニル化が可能であること、またそれらの酵素活性パラメーターの算出を行った。最後に、C1、C2、C3 のアルキル鎖を側鎖修飾されたシステイン誘導体 (Cys (Me)、L-Cys (Et)、L-Cys (All)) を活性化できるように、10 番目のモジュールに含まれる A ドメインに対して変異を加え、結果これらのアデニル化が可能となるモジュール 10 の変異体の構築に成功した。本来は、この変異体をリードとして、図 8 に示した擬似基質を用いたセレクション系に進んでいきかけたのであるが、本期間内に達成しきれなかったのは非常に残念である。しかし引き続き検討を進めることで、本研究目的の達成を目指していきたい。

(引用文献)

- 1) Kimura, R.; Shibata, M.; Koeda, S.; Miyagawa, A.; Yamamura, H.; Mizuno, T. Development of New Antimicrobial Agents from Cationic PG-Surfactants Containing Oligo-Lys Peptides. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 4072-4082.
- 2) Sumito, N.; Koeda, S.; Umezawa, N.; Inoue, Y.; Tsukiji, S.; Higuchi, T.; Mizuno, T. Development of Cell-Penetration PG-Surfactants and Its Application in External Peptide Delivery to Cytosol. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 821-833.
- 3) Sussmuth, R. D.; Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 3770-3821.
- 4) He, Z.; Kislá, D.; Zhang, L.; Yuan, C.; Green-Church, K. B.; Yousef, A. E. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 168-178.
- 5) Kim, J. F.; Jeong, H.; Park, S. Y.; Kim, S. B.; Park, Y. K.; Choi, S. K.; Ryu, C. M.; Hur, C. G.; Ghim, S. Y.; Oh, T. K.; et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 6103-6104.
- 6) McQuade, T. J.; Shallop, A. D.; Sheoran, A.; Delproposto, J. E.; Tsodikov, O. V.; Garneau-Tsodikova, S. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis. *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 244-250.
- 7) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **2006**, *65*, 15-26.